

明細書

免疫応答システムを利用したドラッグデリバリーシステム

技術分野

本発明は、オリゴ糖被覆リポソームを用いたドラッグデリバリーリポソーム組成物に関する。より詳細には、本発明は、腹腔内に投与した際に腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達されることを特徴とする、オリゴ糖被覆リポソームを用いたドラッグデリバリーリポソーム組成物に関する。

背景技術

癌の術後の再発は癌患者の生存率の向上を阻む最大の障壁となっており、この再発を抑制することは癌の臨床上最も重要な課題の一つである。根治手術後の再発の主たる原因は手術時に既に撒布されている遊離癌細胞あるいは目に見えない微小転移によると考えられており、この微小転移を検出して治療することは、癌患者の予後に直結する重要な課題である。胃癌では、根治手術後の再発形式として腹膜再発が50%以上を占め、患者の予後を決める最も重要な因子である。現在の Golden standard、腹腔洗浄細胞診による細胞診陽性の診断は予後不良を意味する。

しかしながら、細胞診陰性の症例からの腹腔再発が少なからず見られるなど、上記の方法は検出感度が低く、腹膜微小転移の検出は事実上不可能である。これまでの所、癌胎児抗原（CEA）を指標とするRT-PCR法を用いた腹腔内遊離癌細胞の高感度の検出法が確立されている。また、1995年から臨床検体を用いた解析を8年に渡って行った結果、腹膜再発のリスクの高さが生命予後に直結していることが明らかになっている。現在、高度先進医療として、腹腔内再発のリスク評価を行うとともに、胃癌患者の予後改善のための治療法の開発が検討されている。

一方、抗癌剤の投与に際して、リポソームは、より選択的に癌局所へ抗癌剤を

到達させ、治療効果を高めると同時に正常組織への集積を抑えることで副作用の軽減を図る目的で用いられている。血管内に投与されたりポソームは、血管透過性の亢進した腫瘍血管では癌組織中に漏れ出し、局所に滞留する性格を有している。従って、薬剤送達システムとしては、passive targeting と呼ばれるものである。一方、抗体などの特異的結合能を利用した薬剤送達システムは active targeting と呼ばれている。従来の方法はリポソームを直接、癌細胞へ到達させることを目的としている。この場合、リポソームは、血中のマクロファージには取り込まれないようにしつつ血行性に癌部に送達することを目的として、開発されてきた。

発明の開示

上記の通り、腹膜微小転移の有無の検出は可能になりつつあるが、腹膜微小転移の局所を特定する方法は存在しない。胃癌の臓腹腔内転移は、乳斑と呼ばれる大網や散在する腸間膜の節外性小リンパ節を足がかりとして生じることが臨床的に知られている。本発明者らはこれまでに、GFP遺伝子を導入した転移性細胞と、簡便なGFP検出システムを組み合わせることにより、乳斑に生じてくる微小転移を非侵襲的に可視化できる微小転移マウスモデルを確立し、微小転移が大網や腸管膜リンパ節に生じてくることを見出し、さらにマウスを用いた実験で初期腹腔内転移の早期に抗癌剤を投与すると有効であることを見出している。しかし、腹腔という広い空間に薬剤を投与すると薬剤の有効濃度に至らない、あるいは有効濃度に維持しようとするれば非常に高濃度の薬剤を投与することとなり、薬剤の血中移行など副次的な問題が生じるため、現時的ではなく、有効な投与方法がないのが現状である。従って、腹膜微小転移相という局所にドラッグデリバリーシステムで薬剤を集中させることができれば、有効な投与方法となりうる。即ち、本発明は、抗癌剤などの投与物質を標的部位に効率良く集積させることができるドラッグデリバリー組成物を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、オリゴマンノース

で被覆したリポソームを腹腔内に投与すると、非常に特異的かつ迅速に腹腔内常在性マクロファージによって取り込まれることを見出した（図1）。また、このオリゴマンノース被覆リポソームを特異的に取り込んだマクロファージが12時間から24時間という短時間で初期腹腔内転移の生じる局所である乳斑と呼ばれる大網や腸管膜リンパ節に散在する節外性リンパ節に集積することを見出した（図2）。また、実際に腹腔内におけるオリゴマンノース被覆リポソームを取り込んだマクロファージの集積場所と癌細胞の微小転移の生じる場所が同じであることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含む、投与物質を標的部位に送達するためのドラッグデリバリーリポソーム組成物が提供される。

好ましくは、オリゴ糖はオリゴマンノースであり、さらに好ましくは、オリゴ糖はマンノペンタオース又はマンノトリオースである。

好ましくは、投与物質は、薬物、マーカーまたは造影剤である。

好ましくは、薬物は抗癌剤である。

好ましくは、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、腹腔内に投与され、腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達される。

好ましくは、標的部位は、腹腔内の節外性小リンパ組織又は腸管膜リンパ組織である。

好ましくは、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、磁性化合物を封入したオリゴ糖被覆リポソームと一緒に組み合わせて投与される。

本発明の別の側面によれば、オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含むドラッグデリバリーリポソーム組成物をヒトを含む哺乳動物に投与することを含む、投与物質を標的部位に送達する方法が提供される。

好ましくは、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、磁性化合物を封入したオリゴ糖被覆リポソームと一緒に組み合わせてヒトを含む哺乳動物に投与し、その後、外部から磁場を照射することができる。

図面の簡単な説明

図1は、M3-DPPE 被覆リポソームと M3-DPPE で被覆していないリポソームをマウスに投与して、1時間後に細胞を回収し腹腔内細胞（F4／80陽性細胞）への取込みを観察した結果を示す。

図2は、大網への M3-DPPE 被覆リポソームの集積を経時的に観察した結果を示す。

図3は、大網内への抗癌剤封入糖鎖被覆リポソームと磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソームの至適取り込み条件を調べた結果を示す。

図4は、抗癌剤（5FU）を投与したマウスと投与しないマウスを開腹しがんの増殖を GFP の蛍光を指標に観察した結果を示す。

図5は、抗癌剤（5FU）を投与したマウスと投与しないマウスを開腹しがんの増殖を GFP の蛍光を指標に観察した結果を示す。

図6は、抗癌剤（5FU）を投与したマウスと投与しないマウスを開腹しがんの増殖を GFP の蛍光を指標に観察した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について具体的に説明する。

本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含むことを特徴とするものであり、投与物質を標的部位に送達するために使用される。さらに具体的には、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、腹腔内に投与された場合に、腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達される。本発明における標的部位は、好ましくは、癌の初期腹腔内転移病巣である大網や腸管膜の節外性小リンパ組織である。

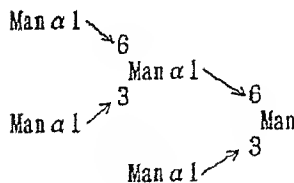
本発明で用いるオリゴ糖被覆リポソームとしては、例えば、特許第2828391号公報に記載のリポソームを用いることができる。オリゴ糖を構成する糖成分の種類は特に限定されないが、例えば、D-マンノース（D-Man）、L-

フコース (L-Fuc)、D-アセチルグルコサミン (D-GlcNAc)、D-グルコース (D-Glc)、D-ガラクトース (D-Gal)、D-アセチルガラクトサミン (D-GalNAc)、D-ラムノース (D-Rha) などが挙げられる。

オリゴ糖中で、各構成糖は、 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合又は $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合等あるいはこれらの組合せにより結合している。例えば、マンノースは上記の結合により単鎖を構成してもよく、又は $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合との組合せにより分枝構造をとってもよい。オリゴ糖中の単糖の数は、好ましくは2～11個である。具体的なオリゴ糖として、例えばマンノビオース (Man2)、マンノトリオース (Man3)、マンノテトラオース (Man4)、マンノペンタオース (Man5)、マンノヘキサオース (Man6)、マンノヘプタオース (Man7)、種々の混合オリゴ糖、例えば下記に示すM5 (式1) 及びRN (式2) 等を挙げることができる。

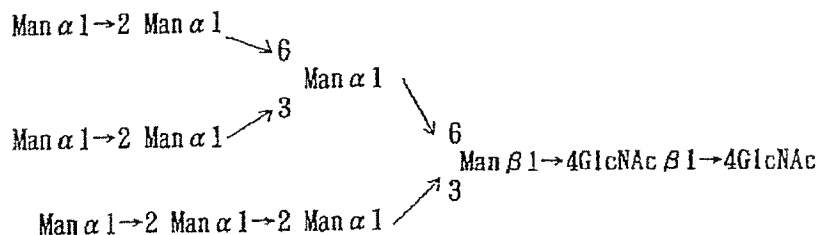
式1

M5



式2

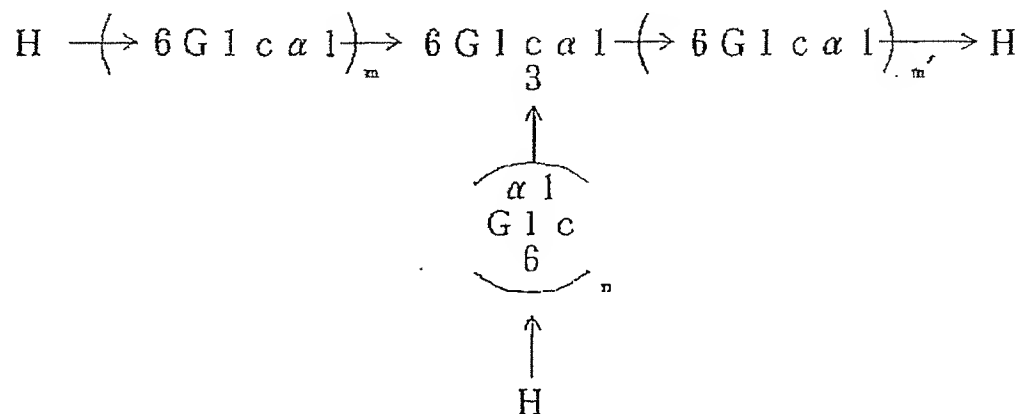
RN



(式中、 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合しているManは、それぞれ独立に、存在してもよく存在しなくてもよい。)

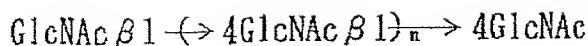
さらに、グルコースを含有するオリゴ糖として式3に示す構造を有するものを挙げることができ、N-アセチルグルコサミンを含むオリゴ糖として式4に示すものを挙げる事ができ、そしてフコースを含むオリゴ糖として式5に示すものを挙げる事ができる。

式 3

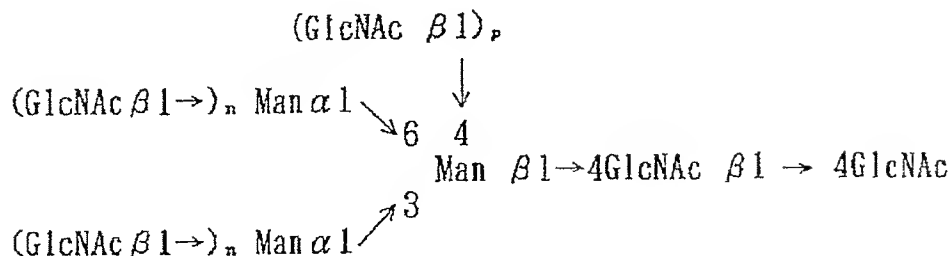


($m+m'+n$ は1~10)

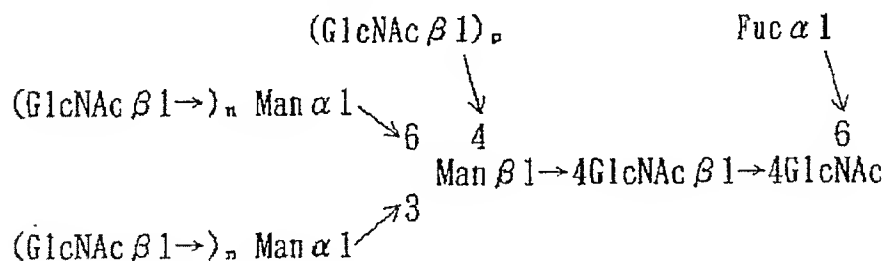
式 4



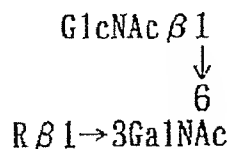
(n は 0 ~ 4)



(p は 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。式中右側の 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基は、それぞれ独立にあってもなくてもよい。また、(GlcNAc β 1 \rightarrow)_n で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



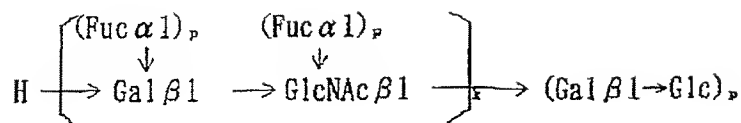
(p は 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。また、(GlcNAc β 1 \rightarrow)_n で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



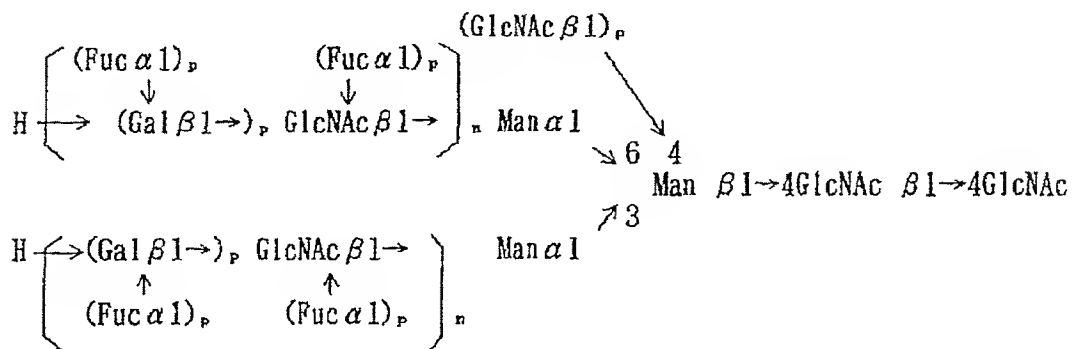
R は H, GlcNAc、又は (GlcNAc β 1 \rightarrow 6)_p (GlcNAc β 1 \rightarrow 3)_pGal

(p は 0 又は 1 である。)

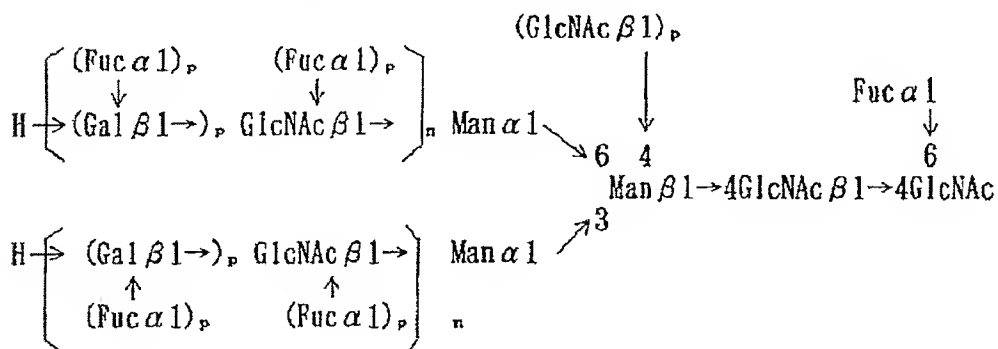
式 5



(k は 1～5 であり、p はそれぞれ独立に 0 又は 1 である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



(p はそれぞれ独立に 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0～3 である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4GlcNAc β 1→4GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)



(pはそれぞれ独立に0又は1であり、nはそれぞれ独立に0～3である。
矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4GlcNAc β 1→4GlcNAc で示した2つのGlcNAc残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)

本発明で用いるオリゴ糖は好ましくは、オリゴマンノースであり、特に好ましくはマンノペンタオース又はマンノトリオースである。

上記のオリゴ糖は、いずれも1個の還元末端アルデヒド基を有する。そこで、このアルデヒド基を、オリゴ糖をリポソーム表面に導入するための手段として使用することができる。すなわち、このアルデヒドと、アミノ基を有する脂質との間に反応によりシッフ塩基を形成し、次にこのシッフ塩基を、常法に従って、還元、好ましくは化学還元、例えば NaBH_3CN により還元することにより、オリゴ糖と、脂質とを結合することができる（水落次男、糖質工学、224-232頁、産業調査会バイオテクノロジー情報センター、1992）。

上記のアミノ基を有する脂質は、好ましくはアミノ基を有するリン脂質であり、例えばホスファチジルアミン、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）等を使用することができる。上記のようにして得られた、オリゴ糖と脂質との結合物を、本発明においては人工糖脂質と称する場合がある。

リポソームを構成する脂質としては、リポソームを構成するために知られている任意の常用の脂質を単独で又は複数組み合わせ使用することができる。例えば、天然物、例えば卵黄、大豆、又はその他の動植物から得られる脂質、これらの脂質を修飾したもの、例えば水素添加によって不飽和度を低下したもの、あるいは化学合成したものを使用することができる。具体的には、例えば、ステロール類、例えばコレステロール（Chol）；ホスファチジルエタノールアミン類、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）；ホスファチジルコリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）；ホスファチジルセリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）、ジステアロイルホスファチジルセリン（DSPS）；ホスファチジン酸類、例えばジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）、ジステアロイルホスファチジン酸（DSPA）、等が挙げられる。

リポソームの作製は公知の方法 [D. W. Deamer, P. S. Uster, "Liposome" ed. by M. J. Ostro, Marcel Dekker Inc., N. Y. Basel, 1983, p27] を用いて行うことができる。ボルテックス法および超音波法が一般的であるが、そのほかにエタノール注入法、エーテル法および逆相蒸発法などが適用でき、これらを組合せて使用することもできる。

例えば、ボルテックス法および超音波法においては、所定の脂質を有機溶剤、例えばメタノール、エタノール、クロロホルム又はこれらの混合物、例えばメタノールとクロロホルムとの混合物に溶解した後、該有機溶剤を蒸発除去することにより脂質の薄層を得る。次に、この脂質の薄層に水性媒体を加えてボルテックス処理又は超音波処理することによりリポソームが形成される。この際に、上記水性媒体に、薬物、マーカ―または造影剤などの投与物質を混入、例えば溶解又は懸濁させておくことにより、該投与物質をリポソームに封入することができる。

オリゴ糖をリポソームの表面に導入するためには、例えば、次の2つの方法のいずれかをを用いればよい。前記の人工糖脂質が水溶性で有機溶剤に十分溶解しない場合、例えば、前記のM5とDPPEとの結合物(M5-DPPE)、RNとDPPEとの結合物(RN-DPPE)を用いる場合には、これらの水性溶液を調製し、これを形成されたリポソームと混合して、例えば4℃ないし室温において24～120時間、例えば約72時間インキュベーションすればよい。

他方、人工糖脂質が有機溶剤に溶解する場合には、該人工糖脂質を、リポソーム構成用脂質と共に、リポソーム製造過程において前記のごとき有機溶剤に溶解し、以後、常法に従ってリポソームを形成すればよい。リポソームの量に対するオリゴ糖の量はオリゴ糖の種類、封入しようとする抗原の種類、リポソームの組合せ構造等により異なるが、一般に、リポソームを構成する脂質1mgに対して5 μ g～500 μ gである。

本発明で用いるリポソームは、多重層タイプ (multilamella vesicle) であってもよく、また単層タイプ (unilamella vesicle) であってもよい。これらは既知の常法に従って調製することができ、また常法に従って一方のタイプを他方の

タイプに、例えば多重層タイプのリポソームを単層タイプのリポソームに転換することもできる。本発明で用いるリポソームの粒径は特に限定されないが、必要により常法に従って、例えば所望の孔サイズのフィルターにより濾過することにより、粒径を整えることができる。

本発明で用いる投与物質は、好ましくは、薬物、マーカー、または造影剤である。薬物としては、抗癌剤、癌ワクチン、抗原ペプチド、免疫活性化剤（ピシバニールなど）、サイトカイン、血管新生阻害剤などが挙げられる。

本発明で用いることができる抗癌剤の種類は特に限定されず、アルキル化薬（例えば、シクロホスファミド、塩酸ニムスチン、イホスファミド、ラニムスチン、チオテパ、メルファラン、ブスルファン、ダカルバジン、カルボコン、塩酸プロカルバジンなど）、代謝拮抗薬（例えば、シタラビン、テガフル、シタラビンオクホスファート、エノシタビン、リン酸フルダラビン、レボホリナートカルシウム、塩酸ゲムシタビン、メトトレキサート、メルカプトプリン、カルモフル、6-メルカプトプリンリボシド、ヒドロキシカルバミド、フルオロウラシル、ホリナートカルシウム、ドキシフルリジンなど）、分子標的治療薬（チロシンキナーゼ阻害薬）又はアルカロイド（硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンデシン、硫酸ビンブラスチンなど）が挙げられる。

マーカーとしては、GFPなどの蛍光タンパク質、フルオロ・デオキシ・グルコースなどが挙げられる。また、造影剤としては、非イオン性水溶性ヨード造影剤、水溶性ヨード造影剤、低浸透圧水溶性ヨード造影剤などが挙げられる。

リポソームの量に対する投与物質の量は、投与したリポソーム組成物が腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達されるという本発明の効果が得られる限り特に限定されず、投与物質の種類やリポソームの組成や構造等により適宜設定することができる。一般的には、投与物質の量は、リポソームを構成する脂質1mg当たり1 μ g～100 μ gである。

本発明のリポソーム組成物は、所望により薬学的に許容される担体を含んでいてもよい。担体としては、滅菌水、緩衝液又は食塩水を用いることができる。ま

た、本発明のリポソーム組成物は、所望により塩類、糖類、蛋白質、澱粉、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコール等を含んでいてもよい。

本発明のリポソーム組成物の投与経路は特に限定されないが、好ましくは腹腔内に投与することができる。本発明のリポソーム組成物の投与量は、投与物質の種類、投与経路、症状の重篤度、患者の年齢および状態、副作用の程度等により変動するが、一般に、 $0.1 \sim 100 \text{ mg/kg/日}$ の範囲である。

本発明のリポソーム組成物を投与する場合、磁性化合物を封入したオリゴ糖被覆リポソームと一緒に組み合わせて投与することもできる。本発明で用いる磁性化合物としては、磁界下で発熱または振動をするような磁性微粒子を用いることが好ましい。この場合、オリゴ糖被覆リポソームと抗癌剤とを含むリポソーム組成物と、オリゴ糖被覆リポソームと磁性化合物とを含むリポソーム組成物とを混合して得られる混合物を生体に投与することができる。この場合、大網に取り込まれた当該リポソーム組成物を貪食したマクロファージから、外部磁場をかけることにより抗癌剤を放出させることができ、これにより、この部位に転移している腫瘍組織を効率的に抑制することが可能になる。

次に本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物の利用方法について説明する。

(1) 腹腔内マクロファージを運び屋とした、腹腔内節外性リンパ組織への抗癌剤のドラッグデリバリーシステム

M3リポソーム(FITC-BSAを封入)を腹腔内に投与すると、時間経過にともない大網及び腸管膜リンパ組織(乳斑)へ集積してくる。腹腔内の免疫系を破綻させたマウスでは、リポソームが脾臓へ一部送達されるが、そうでない場合には、脾臓に存在するマクロファージへの取り込みはほとんど見られない。ゆえに、このリポソームに抗癌剤を封入すると、腹腔内リンパ節に生じた転移初期病変に抗癌剤を集積して働かせることが可能となる。有効な抗癌剤は、強い副作用を持つことが多く、この点を改善するために種々のドラッグデリバリーシステムが考案されている。抗腫瘍効果は一般に腫瘍内の薬剤濃度に依存しているので、

M3 リポソームを用いることで腫瘍局所に集積できる技術は、抗癌剤デリバリーシステムとして広く利用できる。本発明のシステムは、以下の3つの免疫学的機序に基づくステップに基づいている。

(i) 表面にマンノースを抱合したM3 リポソームは、会合したマクロファージによって特異的、迅速に貪食されリソソームへ蓄積される。

(i i) マンノース受容体を介した細胞内取り込みは、マクロファージを活性化する。この活性化によって、マクロファージは抗原提示するために領域リンパ節辺縁洞に集積する。

(i i i) リンパ節に到達したマクロファージは、リソソームで消化しきれないものを接着面細胞外へ排出する。

この方法を用いることで、効率よく高濃度の抗癌剤を腫瘍局所に集積でき、集積後は長時間にわたり緩やかに抗癌剤がマクロファージから排出されることで、腫瘍局所のみを長時間抗癌剤に曝露させることが可能である。さらに集積したマクロファージに熱等のコントロールされたストレスを体外から与えることで、積極的かつ能動的に排出させることができる。

(2) 腹腔内マクロファージを運び屋とした、腹腔内節外性リンパ組織へのがんワクチンデリバリーシステム

オリゴマンノース被覆リポソームの使用は、癌ワクチンにも応用できる技術である。癌ワクチンの効果は、いかに効率よく癌抗原を抗原提示細胞に抗原情報をインプットし、より効果的に癌細胞を攻撃させる免疫活性を誘導できるかという点が重要であると考えられている。この点において、オリゴマンノース被覆リポソームに癌抗原と免疫賦活剤を封入し、腹腔内に散布すると、これらの薬剤はマクロファージによって送達され、癌の転移巣となる領域リンパ組織に到達し、局所での免疫活性を亢進させることができる。これまでの癌免疫療法で問題となっていた、免疫反応の活性化が不十分であったことによるワクチンの効果の弱さは、癌病巣局所での抗腫瘍免疫活性化によって改善することができる。

(3) 蛍光物質などを封入したオリゴマンノース被覆リポソームによる初期腹腔内転移危険部位の検出

RT-PCR法を用いた高感度の検出法によって腹腔内遊離癌細胞の存在が確かめられ、腹膜微小転移の可能性が高いと判断された場合でも生存率は50%程度である。このことは、腹膜微小転移局所の特定ができずにいることと無関係ではない。オリゴマンノース被覆リポソームを取り込んだマクロファージの集積場所と癌細胞の微小転移の生じる場所が同じであるという事実から、蛍光タンパク質などを術中でも認識容易な物質を封入したリポソームを術前24時間前に投与することにより腹膜微小転移の高発部位を検出することが可能であり、予防的に最小限の侵襲で切除することが可能となる。

(4) 他の応用

(A) 癌リンパ節転移に対する治療への応用

近年増加している乳癌では、リンパ節転移が患者予後に大きく影響する一方、広範なリンパ節廓清でも予後が改善されないことが理由となり、主たる治療法は縮小手術と化学療法の組み合わせに移行しつつある。乳癌では、腋下、鎖骨上窩、傍胸骨リンパ節を領域リンパ節としているので、これらからの再発が間々みられる。抗癌剤を入れたM3リポソーム、もしくは癌免疫療法として癌抗原と免疫賦活剤を入れたM3リポソームを、手術後病巣近傍へ注入することで、マクロファージにより領域リンパ節への効果的な薬剤送達が期待され、薬物療法のさらなる効果が期待される。この他にも同様の機序に基づいて、リンパ節好転移癌であるメラノーマ、甲状腺癌、肺癌の治療にも適応できる。

(B) 血液系腫瘍への適応

血液系腫瘍では、単核球、マクロファージ系の分化を示す腫瘍が治療適応対象となる。本発明のM3リポソームに入れた抗癌剤を分子標的性の高いものとすれば、腫瘍以外のマクロファージに取り込まれた場合でも、副作用を軽減することができ、腫瘍細胞に限った薬効を期待できる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によ

って限定されるものではない。

実施例

実施例 1 : オリゴ糖被覆リポソームの製造方法および薬物、マーカ―又はまたは、造影剤の封入方法

以下の方法により、マンノペンタオース (M5) (化 1 に示した化合物) 又はマンノトリオース (M3) ($\text{Man } \alpha 1 \rightarrow 6$ ($\text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3$) Man という構造を有するマンノトリオース ($\text{Man } 3$)) と、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) とを還元アミノ化反応で化学的に結合させ M5-DPPE および M3-DPPE を合成した。

先ず、マンノペンタオース (M5) 又はマンノトリオース (M3) 2.5 mg に 600 μl の蒸留水を加えて攪拌溶解してオリゴ糖溶液を調製した。次に、クロロホルム/メタノール (1 : 1、体積比) 混合液に DPPE を 5 mg / ml の濃度で溶解して DPPE 溶液を調製した。また、メタノールに、 NaBH_3CN を 10 mg / ml の濃度に溶解して NaBH_3CN 溶液を調製した。前記オリゴ糖の各溶液 600 μl に前記 DPPE 溶液 9.4 ml および前記 NaBH_3CN 溶液 1 ml を加えて攪拌混合した。この反応混合液を 60℃ にて 16 時間インキュベートし、人工糖脂質を生成せしめた。合成した人工糖脂質は HPLC を用い高純度に精製した。

TRITC で標識されたタンパク質 (実施例 2) 又は FITC あるいはローダミンで標識されたタンパク質 (実施例 3) を封入したリポソームは、以下のようにして作製した。

先ず、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、コレステロールおよび人工糖脂質 (M5-DPPE または M3-DPPE) を 1:1:0.1 で混合したクロロホルム/メタノール溶液もしくはエタノール溶液をなし型フラスコにいれ、ロータリーエバポレーターで減圧乾固し脂質フィルムを作製した。次いで、TRITC で標識されたタンパク質 (実施例 2) 又は FITC あるいはローダミンで標識されたタンパク質 (実施例 3) を含む PBS 溶液 (5 mg/ml) 0.3 ml を脂質フィルムに加え、ボルテック

スミキサーを用いて激しく攪拌し、M5-DPPE 被覆リポソームまたは M3-DPPE 被覆リポソームを作製した。TRITC で標識されたタンパク質又は FITC あるいはローダミンで標識されたタンパク質としては、FITC-BSA または TRITC-BSA を使用した。

その後、リポソームを PBS で数回洗浄し、リポソームに封入されていない可溶性の物質を遠心により取り除いた。さらにこのリポソームの粒径を $1\mu\text{m}$ のフィルターを用いて整えた。封入タンパク質量はタンパク質定量により、またリポソームの脂質組成比および薬物は HPLC によって定量した。

実施例 2：マクロファージへの取り込みの評価方法と簡単な結果の説明

TRITC で標識された BSA を封入した M5-DPPE 被覆リポソームまたは M3-DPPE 被覆リポソーム（コレステロールとして 100 マイクログラム）をマウス腹腔内に投与し、30分、60分、120分、180分後に腹腔内細胞を常法により回収した。回収した細胞を FITC で標識された抗 CD11c 抗体あるいは F4/80 で染色し、その後 FACS を用いて細胞に取り込まれたローダミンおよび細胞表面抗原 (FITC) の蛍光強度を解析した。

図 1 は M3-DPPE 被覆リポソームと M3-DPPE で被覆していないリポソームを投与し 1 時間後に細胞を回収し腹腔内細胞への取込みを観察したものである。M3-DPPE 被覆リポソームを投与した場合マクロファージのマーカーである F4/80 で染色される細胞の 78% が TRITC の強い蛍光を持っていることから、マクロファージに TRITC で標識されたタンパク質を封入した M3-DPPE 被覆リポソームが取り込まれたことが分かる。一方 M3-DPPE で被覆していないリポソームを投与した場合はほとんど取込みが見られない。図 1 下段で示したように M3-DPPE 被覆リポソームはマクロファージに顆粒状に取り込まれている。

実施例 3：マクロファージまたはリポソームの標的部位への集積の評価方法と簡単な説明

FITC あるいはローダミンで標識されたタンパク質を封入した M3-DPPE 被覆リポ

ゾーム 100 マイクログラム（コレステロール換算）を生理食塩水で希釈し、総量 0.5 ミリリットルをヌードマウス腹腔内に接種した。その後、経時的（3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後）にマウスを屠殺し、観察した。マウスを開腹後、青色光（150W ハロゲン光源、LGPS-2 に 420-480 の band pass filter を装着したもの）をマウス腹腔内の大網を含む上腹部に照射し、黄色の filter（500nm 以上の波長域の可視光を通す long pass filter）を装着した実体顕微鏡（オリンパス GFP 専用チェッカー、SZ40-GFP）下に暗視野で大網への M3 リポゾームの集積を緑色（FITC）としてデジタルカメラを介してパソコンに取り込み評価した。

ローダミンの場合、150W ハロゲン光源に、バンドパスフィルター 545-580 を用い、吸収フィルターとしてロングパスフィルター（590 nm 以上）を用いて観察した。

図 2 は大網への M3-DPPE 被覆リポソームの集積を経時的にみたものである。3 時間後にはすでに集積が認められ、12 時間後に最大集積を示し、その後 24 時間まで集積が認められた。節外性リンパ組織が低形成である $\gamma\delta$ T 細胞欠失マウスではほとんど集積が認められないことから、M3-DPPE 被覆リポソームが節外性リンパ組織に集積していることが分かる。一方 M3-DPPE で被覆していないリポソームでは集積はほとんど見られなかった。

実施例 4：抗癌剤封入リポソームと磁性微粒子封入リポソームによる胃がん腹膜転移の制癌効果確認実験

（1）抗癌剤封入糖鎖被覆リポソームと磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソームの混合投与による大網へのリポソーム集積

抗癌剤封入糖鎖被覆リポソーム（120 μ g/ml of 5FU, 2 mg/ml of cholesterol）および磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソーム（1.5 mg/ml of magnetite, 2 mg/ml of cholesterol）をそれぞれ調整し、以下に示す比率で混合し、マウス腹腔内に投与した。24 時間後、マウスより大網を摘出し、そこに含まれる 5FU および鉄イオンを測定した（図 3）。

A：240 μ g のコレステロールを含む M3/5-FU

20 μ g のコレステロールを含む M3/ML

B : 320 μ g のコレステロールを含む M3/5-FU

40 μ g のコレステロールを含む M3/ML

C : 480 μ g のコレステロールを含む M3/5-FU

20 μ g のコレステロールを含む M3/ML

D : 480 μ g のコレステロールを含む M3/5-FU

40 μ g のコレステロールを含む M3/ML

5-FU 濃度 : 120 μ g/ml ; M3/ML 濃度 : 1.5mg/ml ; コレステロール : 2mg/ml

その結果、抗癌剤封入糖鎖被覆リポソームを 240 μ g cholesterol、磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソームを 20 μ g cholesterol で混合して投与した場合がもっとも集積効率がよいことが判明した。

(2) 上記条件検討ののち、制癌効果の検討を行った。

まず、GFP を導入した胃がん細胞株 MKN 28 を 3×10^6 ノードマウスの腹腔に投与した。24 時間後 GFP の蛍光を指標として癌細胞の生着を確認し、生着が確認されたマウスの腹腔に抗癌剤封入糖鎖被覆リポソームを 240 μ g cholesterol、磁性微粒子封入糖鎖被覆リポソームを 20 μ g cholesterol で混合して投与した。リポソームを投与 24 時間後、交盤磁界照射装置（第一高周波製）、高周波誘導加熱装置（富士電波工機株式会社製。型式 F1H-153HH、出力 : 15Kw、400KHz）で 30 分間交盤磁界照射を行った。その後 1 週間経過した後、マウスを開腹しがんの増殖を GFP の蛍光を指標に観察すると共に、腫瘍の重量を測定した。上記の方法及び結果を図 4～図 6 に示す。腫瘍重量は、対照マウスでは 36.6 mg であったのに対し、抗癌剤 (5FU) で処置したマウスでは 5.2 mg であり、本発明のリポソーム組成物の投与により腫瘍重量は顕著に抑制された。また、GFP の蛍光観察からも抗癌剤 (5FU) で処置したマウスではがんの増殖は抑制されていた。

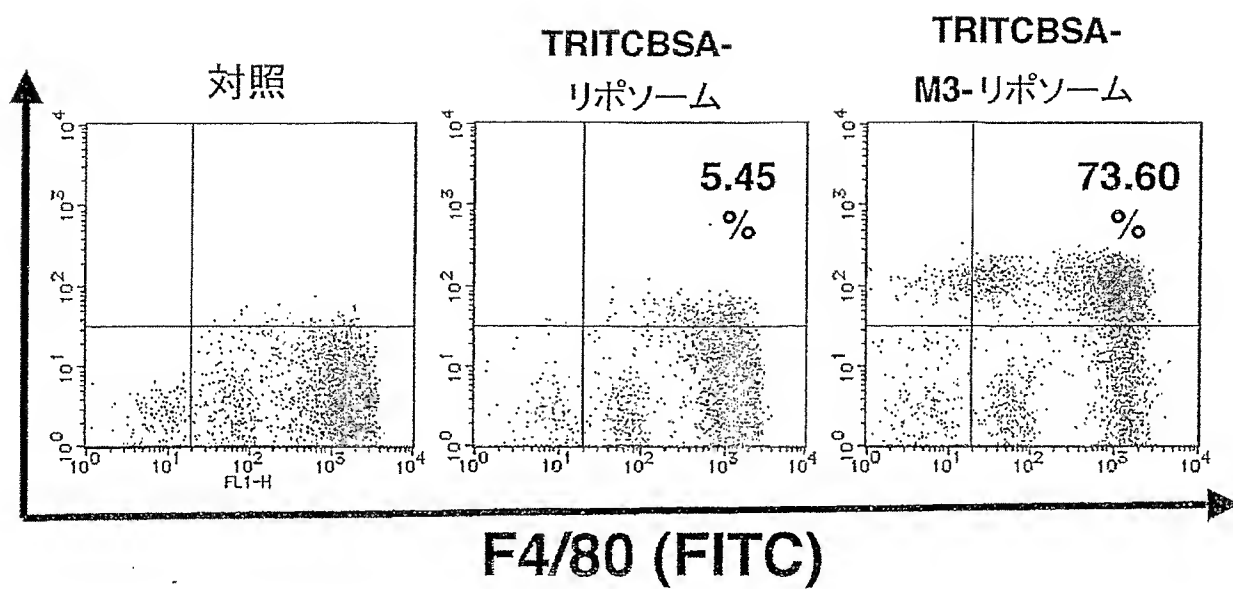
産業上の利用可能性

本発明により、抗癌剤などの投与物質を標的部位に効率良く集積させ、放出させることができるドラッグデリバリーリポソーム組成物を提供することが可能になった。

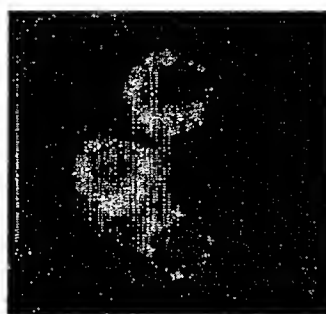
請求の範囲

1. オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含む、投与物質を標的部位に送達するためのドラッグデリバリーリポソーム組成物。
2. オリゴ糖がオリゴマンノースである、請求項1に記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
3. オリゴ糖がマンノペンタオース又はマンノトリオースである、請求項1又は2に記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
4. 投与物質が、薬物、マーカ―または造影剤である、請求項1から3の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
5. 薬物が抗癌剤である、請求項4に記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
6. 腹腔内に投与され、腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達される、請求項1から5の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
7. 標的部位が、腹腔内の癌の初期腹腔内転移病巣である大網又は腸管膜の節外性小リンパ節である、請求項1から6の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。
8. 磁性化合物を封入したオリゴ糖被覆リポソームと一緒に組み合わせて投与される、請求項1から7の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。

図 1



F4/80(FITC)

TRITCBSA-
M3 リポソーム

Merge

図 2

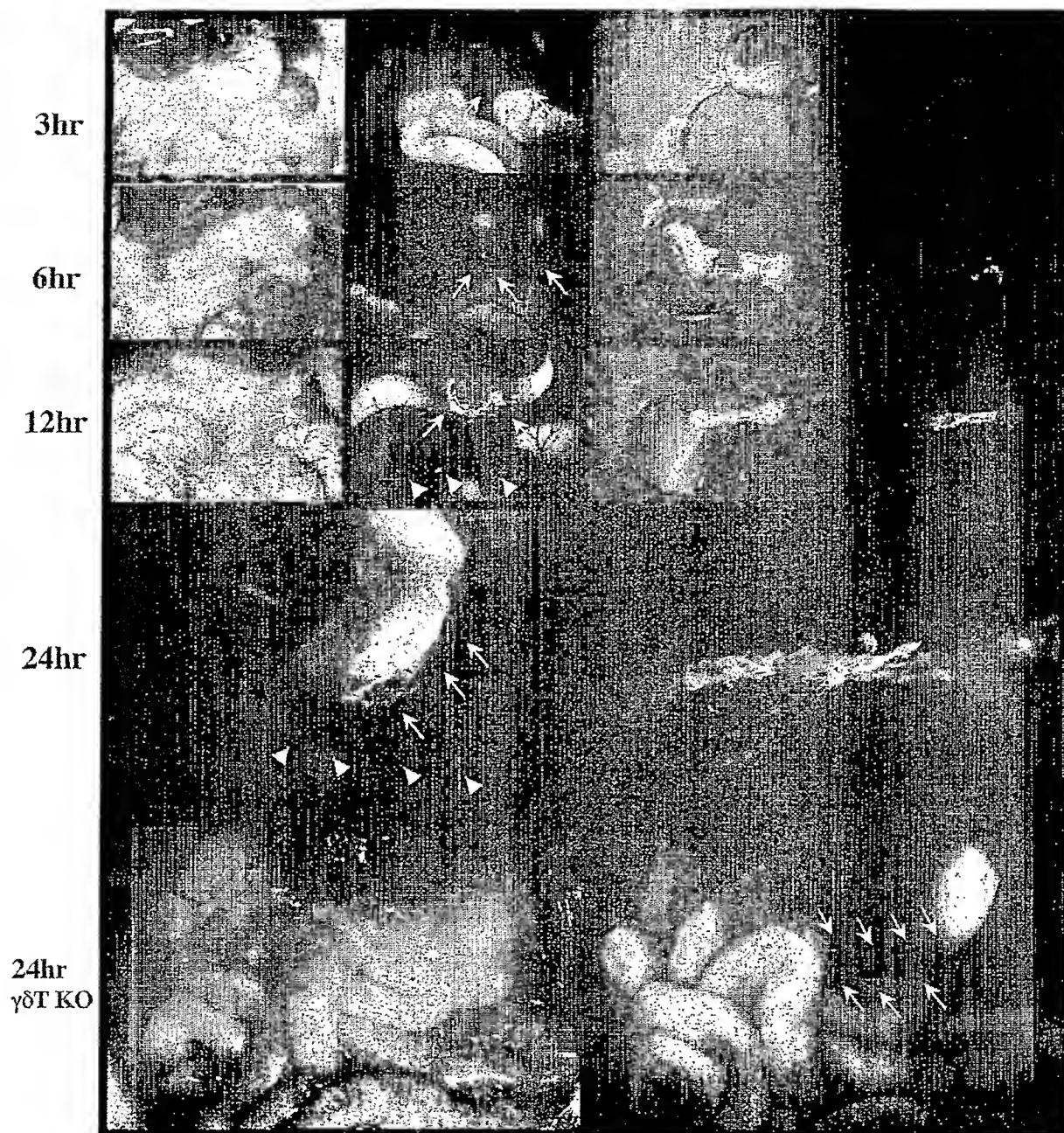


図 3

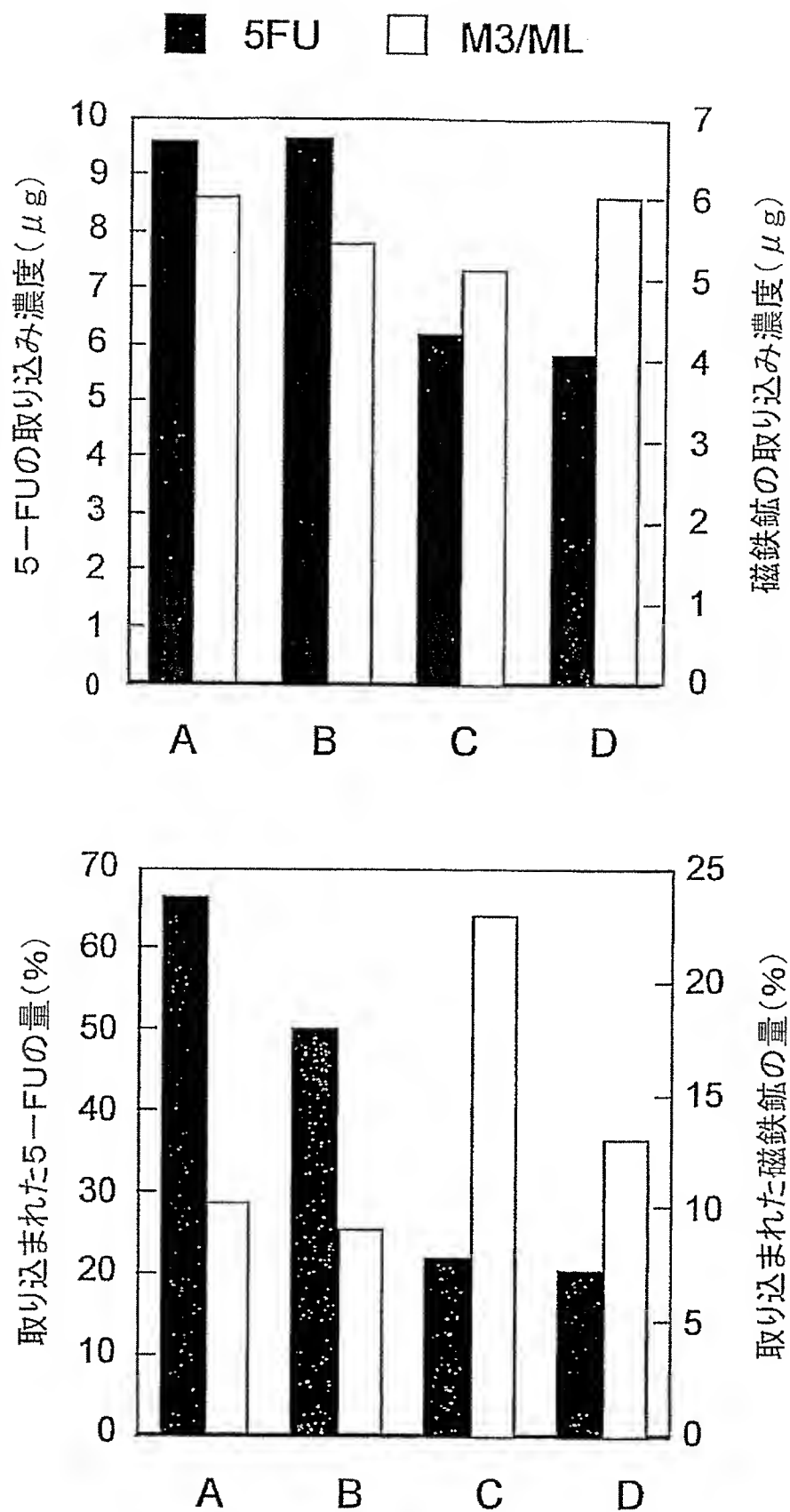


図 4

5FU/MCL 処理
(5FU, 14.4 μ g)



対照

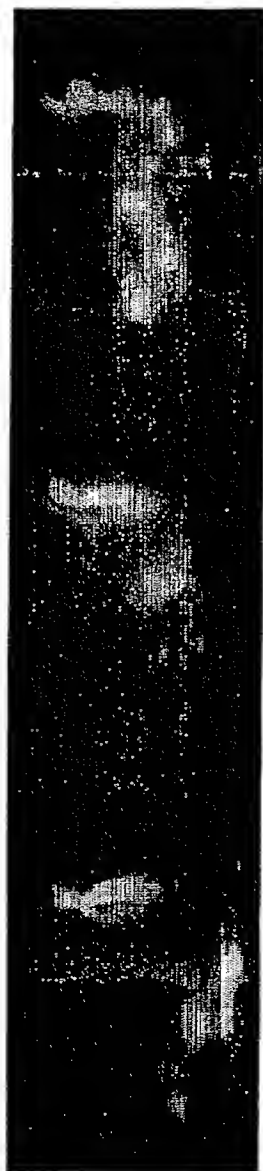


図 5

総腫瘍重量

36.6mg

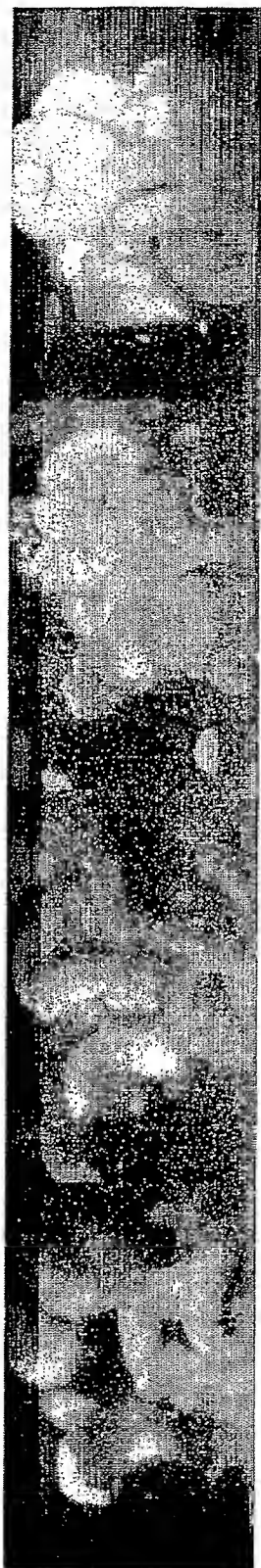
5.2mg



対照

5FU/MC
処理

図 6



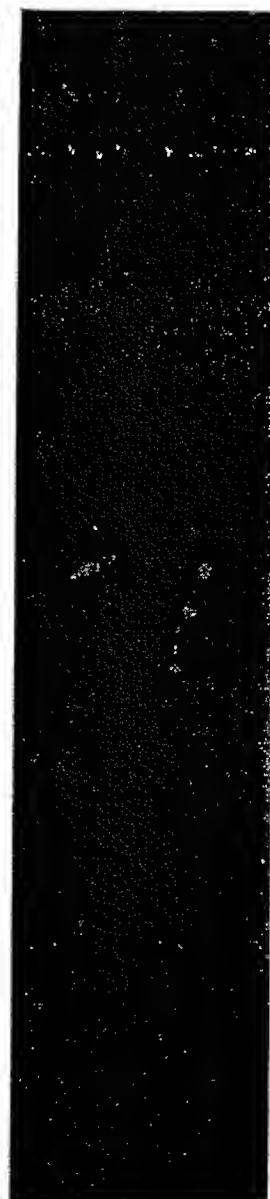
対照



5FU



対照



5FU

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005446

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K9/127, 47/26, 47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K9/127, 47/26, 47/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	JP 62-294432 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)), 21 December, 1987 (21.12.87), Claims; pages 2 to 3 & EP 241376 A1	1-8
X, Y	WO 95/11704 A1 (Tonen Corp.), 04 May, 1995 (04.05.95), Claims; pages 3 to 4 & JP 7-126185 A & EP 677295 A1	1-8
Y	Hitoshi FUJIWARA et al., "Fukumaku Limpa Soshiki no Tokusei ni Motozuku Gan Bisho Fukumaku Ten'i ni Taisuru Hyoteki Idenshi Chiryo", Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy, 2002, Vol.29, No.12, pages 2322 to 2324	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 April, 2005 (21.04.05)Date of mailing of the international search report
17 May, 2005 (17.05.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005446

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Masataka SHIMOMA et al., "Fukumaku Ten'i Keisei ni Okeru Taimo Nyuhan no Igi", Oncologis, 1991, Vol.24, No.3, pages 80 to 85	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K9/127, 47/26, 47/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K9/127, 47/26, 47/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, Y	JP 62-294432 A (サントル・ナショナル・ド・ラ・ルシエルシエ・シヤンティフイツク・(セ・エヌ・エール・エス)) 1987.12.21, 特許請求の範囲, 第2~3頁 & EP 241376 A1	1-8
X, Y	WO 95/11704 A1 (東燃株式会社) 1995.05.04, 特許請求の範囲, 第3~4頁 & JP 7-126185 A & EP 677295 A1	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.04.2005

国際調査報告の発送日

17.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

清野 千秋

4C

3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	藤原 斉 他, 腹膜リンパ組織の特性に基づく癌微小腹膜転移に対する標的遺伝子治療, 癌と化学療法, 2002, Vol. 29, No. 12, pp. 2322-2324	1-8
Y	下間 正隆 他, 腹膜転移形成における大網乳班の意義, Oncologia, 1991, Vol. 24, No. 3, pp. 80-85	1-8

特許協力条約

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 A51027A	今後の手続きについては、様式PCT/ISA/220 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 2005/005446	国際出願日 (日.月.年) 17.03.2005	優先日 (日.月.年) 17.03.2004
出願人 (氏名又は名称) 学校法人東海大学		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った (PCT規則23.1(b))。

b. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでいる (第I欄参照)。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第II欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第III欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第IV欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により
国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこ
の国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 図面に関して

a. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ 出願人は図を示さなかったため、国際調査機関が選択した。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表しているため、国際調査機関が選択した。

b. ☒ 要約とともに公表される図はない。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K9/127, 47/26, 47/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K9/127, 47/26, 47/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, Y	JP 62-294432 A (サントル・ナショナル・ド・ラ・ルシエルシエ・シヤンティフィック・(セ・エヌ・エール・エス)) 1987.12.21, 特許請求の範囲, 第2~3頁 & EP 241376 A1	1-8
X, Y	WO 95/11704 A1 (東燃株式会社) 1995.05.04, 特許請求の範囲, 第3~4頁 & JP 7-126185 A & EP 677295 A1	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.04.2005

国際調査報告の発送日

17.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

清野 千秋

4C

3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (2004年1月)

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

代理人 特許業務法人特許事務所サイクス 様 あて名 〒104-0031 日本国東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階		PCT 国際調査機関の見解書 （法施行規則第40条の2） [PCT規則43の2.1]	
		発送日 （日.月.年） 17. 5. 2005	
出願人又は代理人 の書類記号 A51027A		今後の手続きについては、下記2を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 2005/005446	国際出願日 （日.月.年） 17. 03. 2005	優先日 （日.月.年） 17. 03. 2004	
国際特許分類（IPC）Int.Cl. ⁷ A61K9/127, 47/26, 47/36			
出願人（氏名又は名称） 学校法人東海大学			

1. この見解書は次の内容を含む。 <input checked="" type="checkbox"/> 第I欄 見解の基礎 <input type="checkbox"/> 第II欄 優先権 <input type="checkbox"/> 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成 <input type="checkbox"/> 第IV欄 発明の単一性の欠如 <input checked="" type="checkbox"/> 第V欄 PCT規則43の2.1(a)(i)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 <input type="checkbox"/> 第VI欄 ある種の引用文献 <input type="checkbox"/> 第VII欄 国際出願の不備 <input type="checkbox"/> 第VIII欄 国際出願に対する意見
2. 今後の手続き 国際予備審査の請求がされた場合は、出願人がこの国際調査機関とは異なる国際予備審査機関を選択し、かつ、その国際予備審査機関がPCT規66.1の2(b)の規定に基づいて国際調査機関の見解書を国際予備審査機関の見解書とみなさない旨を国際事務局に通知していた場合を除いて、この見解書は国際予備審査機関の最初の見解書とみなされる。 この見解書が上記のように国際予備審査機関の見解書とみなされる場合、様式PCT/ISA/220を送付した日から3月又は優先日から22月のうちいずれか遅く満了する期限が経過するまでに、出願人は国際予備審査機関に、適当な場合は補正書とともに、答弁書を提出することができる。 さらなる選択肢は、様式PCT/ISA/220を参照すること。
3. さらなる詳細は、様式PCT/ISA/220の備考を参照すること。

見解書を作成した日 21. 04. 2005	
名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 清野 千秋 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

第 I 欄 見解の基礎

1. この見解書は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎として作成された。

☐ この見解書は、_____ 語による翻訳文を基礎として作成した。
それは国際調査のために提出された PCT 規則 12.3 及び 23.1(b) にいう翻訳文の言語である。

2. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に不可欠なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき見解書を作成した。

a. タイプ ☐ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☐ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☐ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

3. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

4. 補足意見：

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についてのPCT規則43の2.1(a)(i)に定める見解、
それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	5, 8	有
	請求の範囲	1-4, 6, 7	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

文献1: JP 62-294432 A (サントル・ナショナル・ド・ラ・ルシエルシエ・シヤンテイフイツク・
(セ・エヌ・エール・エス)) 1987.12.21

文献2: WO 95/11704 A1 (東燃株式会社) 1995.05.04

文献3: 藤原 斉 他, 癌と化学療法, 2002, Vol.29, No.12, pp.2322-2324

文献4: 下間 正隆 他, Oncologia, 1991, Vol.24, No.3, pp.80-85

***請求の範囲1-4, 5, 8:**

請求の範囲1-4に係る発明は、国際調査報告で引用された文献1, 2により新規性及び進歩性を、請求の範囲5, 8に係る発明は進歩性を有さない。

文献1, 2には、マンノペンタオース等のオリゴ糖を表面に有するリポソームと有効成分とを含有する組成物が記載されており、請求の範囲1-4に係る発明と文献1, 2に記載の発明とを組成物として区別することができない。

また、前記有効成分を公知のものから選択してみることは当業者が容易になし得たことである。

***請求の範囲6, 7:**

請求の範囲6, 7に係る発明は、国際調査報告で引用された文献1-4により新規性及び進歩性を有さない。

文献1, 2には、上記組成物が腹腔内に投与され、節外性小リンパ節を標的部位とするものであることについては記載されておらず、その点で本願請求の範囲6, 7に係る発明と文献1, 2に記載の発明とは一応相違するが、投与部位の違いはあっても結局のところ両発明はマンノペンタオース等のオリゴ糖を表面に有するリポソームと有効成分とを含有する組成物であって、これらを組成物として区別することはできない。

なお、文献1, 2には、上記組成物がマクロファージを標的としたものであることが記載されているところ、文献3, 4に記載されているように、癌の腹膜転移が節外性小リンパ節を介して起こり、ここに存在するマクロファージが癌の腹膜転移を薬物治療する際の標的となり得ることもまた公知なのであるから、節外性小リンパ節のマクロファージを標的とした薬物治療に文献1, 2に記載の上記組成物を用いてみることは、当業者が容易になし得たことである。

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

SIKs & Co.
8th Floor, Kyobashi-Nisshoku Bldg., 8-7, Kyobashi
1-chome, Chuo-ku, Tokyo
1040031
JAPON

Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 20 October 2005 (20.10.2005)		
Applicant's or agent's file reference A51027A		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP2005/005446	International filing date (<i>day/month/year</i>) 17 March 2005 (17.03.2005)	
Priority date (<i>day/month/year</i>) 17 March 2004 (17.03.2004)		
Applicant TOKAI UNIVERSITY EDUCATIONAL SYSTEM et al		

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
22 September 2005 (22.09.2005)

CH

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of **19 months** from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **20 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 20-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Yoshiko Kuwahara
Facsimile No. +41 22 740 14 35	Facsimile No. +41 22 338 90 90

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

SIKs & Co.
8th Floor, Kyobashi-Nisshoku Bldg., 8-7, Kyobashi
1-chome, Chuo-ku, Tokyo
1040031
JAPON

Date of mailing (*day/month/year*)
20 July 2006 (20.07.2006)

Applicant's or agent's file reference
A51027A

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP2005/005446

International filing date (*day/month/year*)
17 March 2005 (17.03.2005)

Priority date (*day/month/year*)
17 March 2004 (17.03.2004)

Applicant

TOKAI UNIVERSITY EDUCATIONAL SYSTEM et al

- ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.
- Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
22 September 2005 (22.09.2005)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BW, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SG, SK, SL, SM, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Yoshiko Kuwahara

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt07@wipo.int

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SIKs & Co.
8th Floor, Kyobashi-Nisshoku Bldg., 8-7, Kyobashi
1-chome, Chuo-ku, Tokyo
1040031
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 02 June 2005 (02.06.2005)	
Applicant's or agent's file reference A51027A	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP05/005446	International filing date (day/month/year) 17 March 2005 (17.03.2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 17 March 2004 (17.03.2004)
Applicant TOKAI UNIVERSITY EDUCATIONAL SYSTEM et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
17 March 2004 (17.03.2004)	2004-076804	JP	12 May 2005 (12.05.2005)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 740 14 35	Authorized officer Sarmir Richard Facsimile No. +41 22 338 90 90 Telephone No. +41 22 338 8434
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SIKs & Co.
8th Floor, Kyobashi-Nisshoku
Bldg., 8-7, Kyobashi 1-chome, Chuo-
ku, Tokyo
1040031
Japan

Date of mailing (day/month/year) 20 April 2005 (20.04.2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference A51027A	International application No. PCT/JP2005/005446

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TOKAI UNIVERSITY EDUCATIONAL SYSTEM et al (for all designated States except US)
KOJIMA, Naoya et al (for US)

International filing date : 17 March 2005 (17.03.2005)

Priority date(s) claimed : 17 March 2004 (17.03.2004)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 07 April 2005 (07.04.2005)

List of designated Offices :

AP : BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Marianne ROUX (Fax 338 9090)
Facsimile No. (41-22) 338.90.90	Telephone No. (41-22) 338 9574

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

Date of mailing (day/month/year) 20 April 2005 (20.04.2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference A51027A	International application No. PCT/JP2005/005446

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)
- requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.